# MutaGEL® HLA-DQ 2+8

**Immundiagnostik AG**, D-64625 Bensheim, Stubenwald-Allee 8a, Tel 06251-70190-0, Fax 06251-849430, **www.immundiagnostik.com**

## 1. Verwendungszweck

**Art.-Nr.: KE09020**

Der PCR-Test „**MutaGEL® HLA-DQ 2+8**“ dient der Bestimmung der die **DQ2** und **DQ8**-Serotypen beim Menschen bestimmenden Genmutationen des HLA- (MHC-) Systems. Diese Untersuchung der HLA-DQ2-Genregion und der HLA-DQ8-Genregion erfolgt durch den Nachweis der spezifischen HLA-Allele DQA1*05, DQB1*02 und DQA1*03 und DQB1*0302. Nur zur in vitro Diagnostik.

## 2. Einleitung

Zöliakie (**Z**)/ Glutenunverträglichkeit (**GU**) stellt eine der häufigsten chronisch gastrointestinalen Erkrankungen dar. Die Zöliakie ist ein Krankheitsbild, das durch die Unverträglichkeit der Gliadinfraktion des Weizens und analoger Proteine weiterer Getreidearten gekennzeichnet ist. Die Aufnahme von Gluten mit der Nahrung führt bei Patienten zu einem chronischen, aber reversiblen Schleimhautschaden, der histologisch als Zottenatrophie imponiert. Die Erkrankung ist genetisch mit den HLA-Allelen DQA1*05 (=0501)/ DQB1*02 (=0201 und 0202) sowie DQA1*03 (=0301, 0302, 03**)/ DQB1*0302 assoziiert.

Die **Einheimische Sprue** (**ES**) – nur als Kinderkrankheit **Zöliakie** genannt - ist eine auf **Glutenunverträglickeit** zurückzuführende schwere Krankheit des menschlichen Verdauungssystems, die durch vollständigen Abbau der die Nahrungsaufnahme bewerkstelligenden Dünndarmoberflächen gekennzeichnet ist. Diese Zottenatrophie ist die Folge einer Immunreaktion gegen körpereigene Proteine, die ES ist also (im Unterschied zur wahrscheinlich bakterienverursachten tropischen Sprue) keine Infektions-, sondern eine Autoimmunkrankheit, die sich nach einer Abwehrreaktion gegen Bestandteile von Brotgetreide (Hafer in geringerem Maß) bei diesbezüglich sensiblen Personen durch Antikörperbildung gegen eigene Körpereiweiße (z.B. Transglutaminase oder das Endomysium) entwickelt.

**Sensibel** sind praktisch nur Personen mit der ererbten **Spezifität DQ2** und/ oder **DQ8** des Eigen-/ Fremd-Unterscheidungssystems HLA (=MHC), die bei ES-Kranken also fast immer (≥ 95% der finnischen, 97% der italienischen und 100% der holländischen Patienten) auftritt und die bei ca. 25 - 40% der Gesunden (Mitteleuropäer) vorkommt, wodurch die GU/ ES eine sehr häufige (oft unerkannte) Krankheit sein kann. Die chronischen, aber reversiblen Schleimhautschäden manifestieren sich häufig bereits zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat - die Erkrankung ist nicht nur auf Kinder beschränkt und zudem sind auch extraintestinale Manifestationen einer Glutenunverträglichkeit dokumentiert.

Bei vielen ES-Kranken können die Autoantikörper gemessen werden: der Nachweis der den HLA-Serotypen DQ2 und DQ8 zugrunde liegenden Genmutationen A1*05/ B1*02 (=DQ2) und A1*03/ B1*0302 (=DQ8) besitzt jedoch eine **deutlich höhere Sensitivität**. Infolgedessen ist der PCR-Test **MutaGEL® HLA-DQ 2+8** als **Ausschlußtest für die Verdachtsdiagnose der GU/ ES** geeignet und konzipiert. *Da die Eigenschaft des Vorhandenseins von DQ2/ DQ8* ***alleine nicht hinreichend*** *für die Erkrankung ist, kann die Ermittlung der* ***Anzahl*** *der vorhandenen Sensibilitätsallele (Hetero- bzw. Homozygotie) dazu beitragen das Risiko zu bestimmen, überhaupt mit DQ2/ DQ8 an ES zu erkranken. Die Analyse dieses* ***Gen-Dosis-Effekt*** *über einen ergänzenden PCR-Reagenziensatz von Immundiagnostik komplettiert die genetische Untersuchung.*

## 3. Testprinzip

Die Genmutationen für die HLA-Serotypen DQ2 und DQ8 werden mit zwei PCR-Ansätzen für je eine der Spezifitäten bestimmt, in denen jeweils die Variante des A1- und des B1-Gens durch mutationsspezifische PCR in Multiplex amplifiziert wird und zusätzlich ein Kontrollfragment, das die Funktion des PCR-Ansatzes belegt. Im Kit „MutaGEL® HLA-DQ 2+8“ sind also die spezifischen Primer für DQ2 und DQ8 in zwei separaten Mixen vorpipettiert und können direkt mit extrahierter Proben- gDNA als Ausgangsmaterial zur PCR eingesetzt werden. Das Amplifikations-produkt wird anschließend mit gelelektrophoretischen Methoden identifiziert. Eine interne Human-DNA-Kontrolle garantiert (insbesondere bei Abwesenheit der gesuchten HLA-Allele) den korrekten Verlauf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Methode nach Dr. M. Eßrich, Denzlingen/ Freiburg (Germany).

## 4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)

| | | | |
|---|---|---|---|
| ▪ PCR-**Mix A** (**DQ2**) | **1 x 550 µl** (**braun**) | Test mit Reagenzien für DQ2 spezifische (HLA-DQA1*05 + HLA-DQB1*02) *hotstart* Amplifikation. |
| ▪ PCR-**Mix B** (**DQ8**) | **1 x 550 µl** (**blau**) | Test mit Reagenzien für DQ8 spezifische (HLA-DQA1*03 + HLA-DQB1*0302) *hotstart* Amplifikation. |
| ▪ Positivkontroll-DNA | **1 x 40 µl** (**rot**) | DNA-Lösung positiv für den Nachweis der DQ2- + DQ8- Genregion. |
| ▪ Negativkontrolle | **1 x 50 µl** (transp.) | reines PCR Wasser (deionisiert) |

## 5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- DNA-Extraktionskit (z.B. Art.-Nr.: KBR3005)
- PCR-Wasser (Reinstwasser)
- Thermocycler + Mineralöl oder PCR-Wachs (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel)
- Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Spitzen (möglichst mit Filter)
- Sterile Reagenzgefäße (für Master-Mix-Ansatz bei größerer Probenzahl) und geeignete PCR-Tubes
- Reagenzien und Geräte für die Gelelektrophorese

## 6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagenzien

Die Aufbewahrung erfolgt bei ≤ -18°C. Bei korrekter Lagerung sind die Reagenzien mindestens bis zum Verfallsdatum (auf jeder Einzelverpackung aufgedruckt) stabil.

*Vor Gebrauch*: Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen kurz zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

## 7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro-Diagnostik.
- Test nur durch geschultes Personal nach GLP (Good Laboratory Practice)- Richtlinien durchführen lassen.
- Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle in der Testpackung enthaltenen Reagenzien/ Reaktionsgefäße können nach ihrer Verwendung im Restmüll entsorgt werden.
- Die PCR-Technologie ist extrem sensitiv. Die Amplifikation eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Daher in drei räumlich voneinander abgetrennten Bereichen für a) Probenaufbereitung, b) PCR-Reagenz-Vorbereitung und c) DNA-Detektion arbeiten.
- Es empfiehlt sich der Einsatz steriler Spitzen mit Filter und von für PCR-Zwecke geeigneten Pipetten (für jeden Bereich sollte ein extra Pipettensatz reserviert werden).
- Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.
- Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.

CE

# MutaGEL® HLA-DQ 2+8

**Immundiagnostik AG**, D-64625 Bensheim, Stubenwald-Allee 8a, Tel 06251-70190-0, Fax 06251-849430, **www.immundiagnostik.com**

## Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in drei Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung (Extraktion genomischer DNA).
2. Amplifikation mit den beiden spezifischen Primer-Sets für die HLA DQ2- bzw. DQ8-PCR (Parallelansatz mit beiden Mixen)
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Amplifikate.

## 8. Behandlung zur Probenvorbereitung

Die genomische DNA (z.B. aus ca. 200 µl Vollblut) extrahieren, indem ein handelsüblicher DNA-Extraktionskit entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers verwendet wird. Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, die extrahierte DNA bei ≤-18°C aufbewahren.

## 9. Amplifikation

Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ- Kontrolle beinhalten.
Für jede einzelne Probe, Positiv- und Negativ- Kontrolle sollte folgender Master-Mix **jeweils getrennt für beide Mixe A (DQ2) + B (DQ8)** hergestellt werden (das Reaktionsvolumen dabei mit Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und weitere 10% Volumen addieren):

| PCR- Reagenzien | Gesamt-Reaktions- Volumen: 25 µl | Master-Mix- Volumen |
|---|---|---|
| PCR Master Mix **A** (**DQ2**) bzw. **B** (**DQ8**) | **20 µl** | **20 µl** x (N + 10 %) |

- Je **20 µl** der hergestellten Master-Mixe **A** und **B** in zwei PCR-Reaktionsgefäße vorlegen.
- Proben: jeweils **5 µl** der **extrahierten gDNA** (ca. 30 ng/µl) in die korrespondierenden PCR-Gefäße zupipettieren.
- Positiv-Kontrolle: **5 µl** der **DQ2+8- Positivkontroll-DNA** zum jeweiligen Fertigmix in den PCR-Gefäßen der positiven Referenzen zupipettieren.
- Negativ-Kontrolle: **5 µl PCR-Wasser** zum Master-Mix im PCR-Gefäß der negativen Referenz zupipettieren (hier kann auch eine gemischte Negativkontrolle aus je 50% der Fertigmixe hergestellt werden, um später eine Gelspur einzusparen).
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen und folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen. Wegen der großen Zahl nah verwandter HLA-Gene sollte dieses der Sequenzspezifität förderliche „**Touch Down**" - Cycling-Protokoll durchgeführt werden (ansonsten sollten alternativ **40** Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von **59°C** im PCR-Protokoll verwendet werden – hot Start für TAQ – Enzym dabei nicht vergessen!).

| | |
|---|---|
| **Anfangsphase:** | 95°C für 12 min (*hot start* TAQ – Aktivierung) |
| **5 Zyklen** | 95°C für 30 sec / **70°C** für 30 sec / 72°C für 1 min |
| **5 Zyklen** | 95°C für 30 sec / **65°C** für 30 sec / 72°C für 1 min |
| **30 Zyklen** | 95°C für 30 sec / **59°C** für 30 sec / 72°C für 1 min |
| **Strangverlängerung:** | 74°C für 10 min |
| **Endphase:** | 10°C |

## 10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2%** Agarose (oder 10% Polyacrylamid) für ca. **100 Vh** (z. B. 70 min bei 116 Volt) in 1x TBE-Puffer durchführen: ca. **15 µl** Amplifikat jedes PCR-Ansatzes mit ca. **4 µl** Ladepuffer versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über geeignete DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KDBR311005) abgeglichen werden. Die im Gel getrennte DNA wird in **Ethidium-bromid** bzw. **SybrGreen** (ca. 5 µg/ml) für **5-10 min** angefärbt, unter **UV-Licht (312 nm)** visualisiert und das DNA-Bandenmuster dokumentiert.
- Die PCR liefert für die Positivkontrolle (bzw. bei Vorhandensein entsprechender HLA DQ- Allele in den Proben) bei **Test A (DQ2)** DNA-Fragmente von **119 bp** (DQA1*05) und **204 bp** (DQB1*02) Länge und für **Test B (DQ8)** DNA-Fragemente von **124 bp** DQB1*0302 und **213 bp** (DQA1*03) Länge.
- Zusätzlich wird bei beiden Tests jeweils eine **interne Kontrollbande** von **400 bp** amplifiziert, welche bei Vorhandensein von DQ2-/ DQ8-Allelen jedoch auch schwächer ausgeprägt sein kann (bzw. dann sogar ganz fehlt).

| GENOTYP | Amplifikatlänge (in Basenpaaren) | mögliches Erkrankungsbild |
|---|---|---|
| **DQ2 / -** | 400 (iK) **204** / **119** | **GU / ES** |
| **- / DQ8** | 400 (iK) **213** / **124** | **GU / ES** |
| **DQ2 / DQ8** | 400 (iK) **213** / **204** / **119** / **124** | **GU / ES** |
| **- / -** | 400 (iK) | **Keine** mit GU assoziierte Krankheit |

Die **Positiv-Kontroll-DNA** besitzt den Genotyp **HLA-DQ2 / DQ8** und die **Negativkontrolle** darf zu **keinem** Amplifikat führen.
Bei den **Proben** können **folgende Fälle** auftreten (s. auch Tabelle):

- **Fall 1**: **Test A** und **Test B** sind **beide positiv,** d.h. sie haben jeweils *beide* spezifischen Banden, also insgesamt 4 (mit interner Kontrolle 6). **Befund**: die Probe enthält ein (oder zwei) DQ2 und ein (oder zwei) DQ8-Mutationen, welche mit Glutenunverträglichkeit und einheimischer Sprue/ Zöliakie assoziiert sind. Der Patient hat den **HLA-Typ DQ2/ DQ8** und er **kann** unter dem Gesichtspunkt seiner HLA-Gruppe **Gluten-unverträglichkeit** und **Einheimische Sprue (ES)** entwickeln.
- **Fall 2**: **Test A** ist **positiv** und **Test B** ist **negativ**, d.h. Test A hat beide spezifischen PCR-Banden und Test B hat (außer der 400 bp-Kontrollbande) nur eine oder gar keine spezifische Bande. **Befund**: die Probe enthält ein (oder zwei) DQ2-Mutationen, aber keine DQ8-Mutation. Der Patient hat den **HLA-Typ DQ2** und er **kann** unter dem Gesichtspunkt seiner HLA-Gruppe **GU** und **ES** entwickeln.
- **Fall 3**: **Test A** ist **negativ** und **Test B** ist **positiv,** d.h. Test A hat (außer der 400 bp-Kontrollbande) nur eine oder gar keine PCR-Bande und Test B hat beide spezifischen Banden. Der Patient hat den **HLA-Typ DQ8** und er **kann** unter dem Gesichtspunkt seiner HLA-Gruppe **GU** und **ES** entwickeln.
- **Fall 4**: **Test A** und **Test B** sind **beide negativ**, d. h. weder Test A noch Test B enthalten beide spezifische PCR-Banden, dafür aber jeweils die 400 bp - Kontrollbande. **Befund**: Der Patient hat einen ***anderen*** **HLA-Typ** als die oben genannten und mit hoher Wahrscheinlichkeit (≥ 95 % bis nahezu 100 %) **keine** Einheimische Sprue (s. Einleitungstext), d. h. eine **Glutenunverträglichkeit** kann nahezu **ausgeschlossen** werden.

## 11. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrollen die angegebenen DNA-Fragmente und für die Proben DNA zumindest das interne Kontrollfragment (400 bp). Falls dies nicht der Fall ist, muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden. Bei fehlenden Positivkontroll-Banden erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft/ korrigiert werden.

# MutaGEL® HLA-DQ 2+8

**Immundiagnostik AG,** D64625 Bensheim, Stubenwald-Allee 8a, Tel: ++49-6251-70190-0, Fax: +49(0)6251-849430, **www.immundiagnostik.com**

## 1. Intended Use

**Code: KE09020**

The kit "MutaGEL® HLA-DQ 2+8" allows the detection of the genetic profile determining the HLA class II serotypes DQ2 and DQ8 (MHC system). This is done by an allel-specific detection of the coding HLA-DQ2 resp. HLA-DQ8 alleles DQA1*05, DQB1*02 and DQA1*03 and DQB1*0302. For in vitro diagnostic use only.

## 2. Introduction

Coeliac disease (CD) / gluten intolerance (GI) is one of the most often chronic gastrointestinal diseases. The disease is characterised intolerance for gliadin fractions in wheat or analogous proteins in other cereals. The intake of gluten with food causes by patients chronic but reversible damages of the gastrointestinal mucous membrane which finally manifests histological in villious atrophy of the small intestine. CD/ GI is genetically strong associated with the alleles DQA1*05 (=0501)/ DQB1*02 (=0201 and 0202) and DQA1*03 (=0301, 0302, =03**)/ DQB1*0302.

Endemic Sprue (ES) – in childhood called celiac disease (CD) – leads finally to villous atrophy as consequence of immune-reactions against own proteins: ES is therefore (in contrary to bacterial caused tropic sprue) an autoimmune disease developing antibodies against own body proteins (e.g. transglutaminases or the endomysium) by persons sensible for ingredients of cereals (oats in small dimension).

Sensible are all persons with the inherited specificity DQ2 and/ or DQ8 of the own-/ foreign- discrimination system HLA (= MHC), which is in case of ES are therefore present in superiority (≥ 95% of Finish, 97% of Italian and 100% of Netherland patients) and in normal healthy persons (Europe) about 25 – 40%. This is the reason why CD/ ES is one of the most (often undetected) disease. The chronic damages of the small intestine manifest often during 6$^{th}$ and 18$^{th}$ month. The disease is and not limited exclusively to children and also extra intestinal manifestations are described.

In many patients it is possible to measure the auto-antibodies. But the analysis of the HLA-serotype DQ2 and DQ8 determining genetic profile (mutations A1*05/ B1*02 =DQ2 and A1*03/ B1*0302 =DQ8) possesses much higher sensitivity. Therefore, the PCR test MutaGEL® HLA DQ 2+8 is used for exclusion of suspicious diagnosis for GI/ ES.

*Due to the fact that presence of DQ2/ DQ8* ***alone is not sufficient*** *for development of the disease it is possible to determine the* ***number*** *of present sensibility alleles (heterozygous or homozygous) with the aim to determine the risk for ES manifestation with DQ2/ DQ8 at all: Analysis of that* ***gene-dose effect*** *completes the genetic analysis and could be done with an supplementary PCR reagent set from* ***Immundiagnostik****.*

## 3. Principle of the Test

The kit „MutaGEL HLA-DQ" contains sets of primers which amplify the DQ2-alleles DQA1*0501, DQB1*02 and DQ8-allels DQA1*03, B1*0302. The primer sets are prepared in two separate mixes and can be used for PCR directly with the extracted sample gDNA. The resulting amplification products are subsequently identified with gelelctrophoretic methods. Additionally, an included internal control proofs (especially in absence of the analysed alleles) the correct performance of PCR in each single reaction.

## 4. Material Supplied (for 24 determinations)

| | | | |
|---|---|---|---|
| ▪ PCR-**Mix A** (**DQ2**) | 1 x **550 µl** (**brown**) | ready-to-use Mix with TAQ, dNTP + DQ2-specific oligonucleotides (A1*05 + B1*02). |
| ▪ PCR- **Mix B** (**DQ8**) | 1 x **550 µl** (**blue**) | ready-to-use Mix with TAQ, dNTP + DQ8-specific oligonucleotides (A1*03 + B1*0302) |
| ▪ Positive control DNA | 1 x **40 µl** (**red**) | aqueous solution of human DNA with the (cloned) DNA of HLA-DQ2 gene region |
| ▪ Negative control | 1 x **200 µl** (transparent) | pure PCR water (deionized) |

## 5. Materials Required but not Supplied

- DNA extraction kit (Code: KBR3005)
- PCR water (pure)
- thermal cycler + mineral oil or wax (optional for thermal cycler without heated lid)
- pipettes (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips (with filter)
- sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use
- reagents and instruments for gel electrophoresis

## 6. Storage and Stability

Store at ≤ -18°C. The reagents are stable in the unopened micro tubes until the expiration date indicated (see print on the package).
*Before use*: Spin tubes briefly before opening to collect all solutions at the bottom of the tube (contents may become dispersed during shipment).

## 7. Warning and Precautions

- For in vitro diagnostic use only.
- Test should only be performed only by skilled persons considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines.
- Don't use the kit after its expiration date.
- After usage, dispose all reagents and test components included in the kit in conventional garbage.
- PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates million identical copies. Therefore set up three separate working areas for a) sample preparation, b) PCR reagent preparation and c) DNA detection. For each working area a different set of pipettes should be reserved.
- Wear separate coats and gloves in each working area.
- Use sterile filter tips and special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- Avoid aerosols (especially during opening of the reagent tubes).

CE

## Procedure

The complete procedure is divided in three steps:

1. Sample preparation (extraction of genomic DNA).
2. Amplification with primers specific for the HLA DQ alleles.
3. Detection of the amplified DNA by gel electrophoresis.

## 8. Sample Preparation

For template use total genomic DNA which can be extracted (e. g. from 200 µl of whole blood) using commercial available DNA extraction kits according to the manufacturer`s manual. Start immediately with the amplification procedure or store the extracted DNA at ≤ -18°C.

## 9. Amplification

Every set of amplifications should include a positive as well as a negative control.

For each single sample, positive control and negative control prepare the following Master Mix separately for each of the both primer mixes **A** (**DQ2**) **+ B** (**DQ8**); multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions and add 10% more volume:

| PCR Reagents | Total Reaction Volume: 25 µl | Master Mix Volume |
|---|---|---|
| PCR Master Mix **A** (**DQ2**) resp. **B** (**DQ8**) | **20 µl** | **20 µl** x (N +10%) |

- aliquot **20 µl** of each prepared Master Mix **A** and **B** in **two different** PCR reaction tubes.
- Samples: add **5 µl** of the **extracted DNA** (about 30 ng/ µl) to the corresponding PCR tube.
- Positive control: add **5 µl** of the **HLA DQ2+8 positive control DNA** to the Master-Mix for positive references.
- Negative control: add **5 µl** of PCR water to the Master-Mix for negative reference (a mixed negative control with 50% of each ready to use PCR Mix could here used to save one lane in the gel).
- transfer the micro tubes into the thermal cycler and perform the following amplification protocol. Due to the high number of close related HLA genes should be used the described "**touch down**" cycling protocol (leading to high sequence specificity). In other cases, use alternative a PCR protocol with 40 cycles and the annealing temperature of **59°C** (+ do not forget the *hot start* TAQ enzyme activation step).

| | |
|---|---|
| **Initial phase:** | 95°C for 12 min (activation for *hot start* TAQ enzyme) |
| **5 Cycles** | 95°C for 30 sec / **70°C** for 30 sec / 72°C for 1 min |
| **5 Cycles** | 95°C for 30 sec / **65°C** for 30 sec / 72°C for 1 min |
| **30 Cycles** | 95°C for 30 sec / **59°C** for 30 sec / 72°C for 1 min |
| **Final Phase:** | 74°C for 10 min, follow up 10°C |

## 10. Detection of the amplified DNA and Interpretation of the Results

- Carry out a gel electrophoresis in **2 %** agarose (or 10% polyacrylamide) for about **100 Vh** (e.g. 70 min 116 volts) in 1x TBE-Buffer: mix about **15 µl** of each PCR-reaction with **4 µl** loading buffer (for each extracted DNA are two lanes necessary in order to detect the DNA fragments generated from both primer mixes (**A** and **B**) = two lanes per patient). The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (e. g. KBR311005). The separated DNA is colored in an **ethidium bromide**- or **SybrGreen**- (5 µg/ ml) bath for about **5 - 10 min** and visualised under **UV-light (312 nm)**. The received DNA-band pattern could be (foto-) documented.
- The PCR generates for positive control (and for specific alleles, if present in the patient) for **test A (DQ2)** DNA fragments of **119 bp** (HLA-DQA1*05) and **204 bp** (HLA-DQB1*02). For **test B (DQ8)** DNA-fragments have sizes of **124 bp** (HLA-DQB1*0302) and **213 bp** (HLA-DQA1*03).
- The amplification of an additional **internal control** (human ß-globin gene) leads to a DNA fragment of **400 bp** in case there is no other amplification product (*Please consider:* the internal control may be weak or lack at all in case of an amplification of the clinical relevant DQ-allels).

| GENOTYPE | Length of amplificates (in base pairs) | Potential Clinical Picture |
|---|---|---|
| **DQ2 / -** | 400 (IC) **204** / **119** | **GS / ES** |
| **- / DQ8** | 400 (IC) **213** / **124** | **GS / ES** |
| **DQ2 / DQ8** | 400 (IC) **213** / **204** / **119** / **124** | **GS / ES** |
| **- / -** | 400 (IC) | **NO** with GS associated disease |

The **Positiv Control DNA** possesses the genotype **HLA-DQ2 / DQ8** and the **negative control** does **not** generate any amplificate.

The **Samples** could show the **following results** (s. also table):

- **Case 1**: **test A** and **test B** are **both positive**, means each shows *both* specific bands (all together 4; with internal control 6). **Finding**: the sample contains one (or two) DQ2- and one (or two) DQ8- mutation associated with gluten sensitivity and endemic sprue/ celiac disease. The patient has **HLA type DQ2/ DQ8** and he **can** under viewpoint of his HLA group develop **gluten sensitivity (GS)** and **endemic Sprue (ES)**.
- **Case 2**: **test A** is **positive** and **test B** is **negative**, means test A has both specific DNA bands und test B has (except 400 bp control band) only one or no specific band. **Finding**: the sample contains one (or two) DQ2- mutation but no DQ8- mutation. The patient has the **HLA type DQ2** and he **can** under viewpoint of his HLA group develop **gluten sensitivity (GS)** and **endemic Sprue (ES)**.
- **Case 3**: **test A** is **negative** and **test B** is **positive**, means test A has (except 400 bp control band) only one or no DNA band and test B has both specific band. The patient has **HLA type DQ8** and he **can** under viewpoint of his HLA group develop **gluten sensitivity (GS)** and **endemic Sprue (ES)**.
- **Case 4**: **test A** und **test B** are **both negative**, means neither test A nor test B show both specific DNA bands but only each the 400 bp internal control band. **Finding**: The patient has ***any other*** **HLA type** as mentioned above and does not (with high probability: ≥ 95 % up to 100 %) **no** endemic sprue (s. introduction), means a **gluten sensitivity** can be **excluded** nearly completely.

## 11. Restrictions

The PCR results for all positive controls in DNA fragments of indicated length and for the samples at least in the internal control fragment (400 bp). If this is not the case, the sample must be tested a second time or the complete analysis must be repeated with freshly isolated DNA. If there are no positive control DNA fragments present, the amplification was incorrect and the chosen PCR conditions have to been proven/ corrected.